



Università degli Studi di Napoli
“Federico II”

Dottorato di ricerca in Biochimica e
Biologia Cellulare e Molecolare
XIX ciclo

Ribonucleasi da pesci: clonaggio, purificazione
e caratterizzazione di tre proteine con attività
ribonucleasica e angiogenica da *zebra-fish*

Docente Guida

Dottorando

Prof. Salvatore Sorrentino

Dott. Pasquale Buonanno

Coordinatore

Prof. Giuseppe D'Alessio

Tesi di dottorato 2007

TESI DOTTORATO, 2007 : Biochimica e Biologia Cellulare e Molecolare

INDICE

Sommario	pag. 1
Summary	pag. 2
Introduzione	pag. 3
Materiali e Metodi	pag.17
Risultati	pag.34
Conclusioni	pag.49
Bibliografia	pag.50

SOMMARIO

Le ribonucleasi (RNasi) costituiscono una grande superfamiglia di proteine ad attività enzimatica capaci di degradare l'RNA, il cui capostipite è rappresentato dalla ribonucleasi pancreatica bovina (RNasiA).

Molti membri di tale superfamiglia mostrano attività biologiche importanti correlate alla loro attività ribonucleasica come ad esempio l'angiogenina umana (hAng) la quale promuove la formazione di nuovi vasi sanguigni.

Rappresentanti della superfamiglia sono stati trovati nei mammiferi, negli anfibi, nei rettili e negli uccelli ma mai fino ad ora nei pesci.

Il mio lavoro di tesi si è concentrato sulla ricerca di ribonucleasi nei pesci e a tale scopo sono state clonate, espresse e purificate tre proteine di *zebra-fish* (*Danio rerio*) che mostrano una significativa identità di sequenza con l'RNasiA e con l'hAng.

La caratterizzazione funzionale di tali proteine ne ha confermato l'attività ribonucleasica e due di esse hanno mostrato anche una considerevole attività angiogenica portando così all'identificazione di antenati delle ribonucleasi dei tetrapodi e di antenati delle angiogenine dei mammiferi.

SUMMARY

The pyrimidine-specific ribonucleases (RNases) constitute one of the most investigated superfamily of homologous proteins which cleave RNA; bovine pancreatic ribonuclease (RNaseA) is the first member of this superfamily which was discovered and analyzed.

Over one hundred proteins with significant sequence identity with RNaseA have been isolated so far and some of them show diverse biological functions such as human angiogenin (hAng) which promotes the formation of new blood vessels.

RNases were found in mammals, birds, reptiles and amphibians but never in fishes.

The aim of this study was the discovery of ribonucleases in fishes; three proteins from *zebra-fish* (*Danio rerio*) have been found to have a significant sequence identity with RNaseA and with hAng: the corresponding cDNAs have been cloned, expressed and the three recombinant proteins have been purified.

The functional characterization of these proteins confirmed their ribonucleolytic activity and two of them were found to show also a considerable angiogenic activity. These results led to the identification of the ancestors of tetrapod ribonucleases and mammal angiogenins.

INTRODUZIONE

Le ribonucleasi extracellulari dei tetrapodi costituiscono una grande superfamiglia di proteine enzimatiche a rapida evoluzione che catalizzano la degradazione dell'RNA; i membri di tale superfamiglia, il cui capostipite è costituito dall'RNasi A (ribonucleasi pancreatica bovina), mostrano una identità di sequenza che va dal 30% al 90% sia all'interno della stessa specie che tra specie diverse. Tali enzimi discendono da un unico gene ancestrale attraverso un processo di evoluzione divergente (fig.1), degradano l'RNA con lo stesso meccanismo catalitico e possiedono strutture tridimensionali molto simili, se non identiche (Beintema, J. J., et al., 1997; Beintema, J. J., 1998). La RNasi A (fig.2), una delle prime proteine ad essere stata sequenziata e analizzata, è un piccolo enzima (124 residui, 13.7kDa), con una struttura compatta e molto stabile formata da 5 filamenti β e 3 α eliche. La sua stabilità è da imputare, oltre ai legami a idrogeno intracatena, soprattutto a quattro ponti disolfurici tra i residui cisteinici 40-95, 26-84, 58-110 e 65-72.

Le ribonucleasi dei mammiferi, sulla base delle loro proprietà strutturali, catalitiche e biologiche, possono essere classificate in quattro differenti famiglie (Sorrentino S. e Libonati M., 1997): 1) ptRNasi (ribonucleasi di tipo pancreatico); 2) nptRNasi (ribonucleasi di tipo non pancreatico); 3) pt/nptRNasi (proteine strutturalmente più simili alle ptRNasi ma che possiedono caratteristiche catalitiche sia delle ptRNasi che delle nptRNasi); 4) angRNasi (ribonucleasi con attività angiogenica).

La famiglia delle ptRNasi comprende l'RNasi A, le ribonucleasi pancreatiche di tutti i mammiferi, la RNasi seminale bovina ed alcune

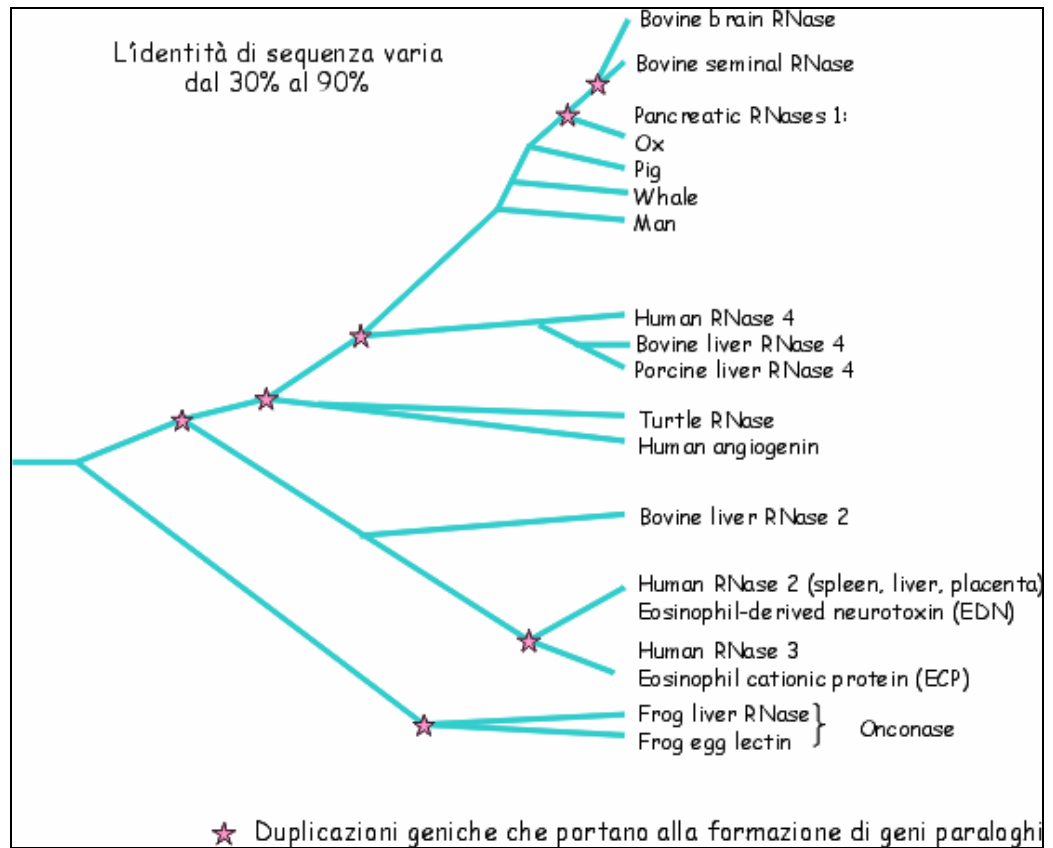


Fig. 1- Albero evolutivo dei membri della Superfamiglia della RNasiA

ribonucleasi cerebrali di ruminanti. Nei mammiferi, tali enzimi non sono prodotti esclusivamente dal pancreas ma anche da altri organi o tessuti come la prostata, il cervello, la ghiandola mammaria e la loro presenza è stata ritrovata anche in fluidi organici quali l'urina, il siero e il plasma seminale; presentano una identità di sequenza del 70 % ed un'elevata omologia con la ribonucleasi pancreatica bovina. Mentre nei bovini ed altri ruminanti vi sono tre geni distinti che codificano per tre differenti ptRNasi (pancreas, cervello, vescichette seminali), nell'uomo vi è un solo gene che codifica per la ptRNasi 1 espressa in molti organi e tessuti. Questa classe di ribonucleasi degrada l'RNA ad un pH ottimale di 8,0, ha la capacità di idrolizzare i nucleotidi 2'-3' ciclici prodotti dalla reazione di transesterificazione, e presenta un grado variabile di affinità per i substrati polimerici sintetici preferendo il poli(C) rispetto all'RNA e al poli(U).

Il sito attivo della RNasi A e di tutte le ribonucleasi pancreatiche dei mammiferi presenta una struttura detta a "sub-siti multipli" (Fig.3), dove i sub-siti che legano i gruppi fosfato dell'RNA (P0, P1, P2, P3 ecc.) hanno la funzione di guidare la molecola di substrato nella sua interazione con l'enzima.

La famiglia delle nptRNasi comprende enzimi ritrovati in organi diversi dal pancreas e per questo denominati "di tipo non pancreatico". Essi hanno caratteristiche strutturali e catalitiche diverse da quelle delle ptRNasi, (Sorrentino, S. e Libonati, M., 1994; Sorrentino e Libonati, 1997; Sorrentino, S., 1998) e presentano una identità di sequenza rispetto a queste ultime del 30-35%. Infatti, tali proteine mancano dei sub-siti per i fosfati dell'RNA (P0, P2, P3), hanno un pH ottimale intorno a 6,5-7,0 e non sono in grado di idrolizzare i nucleotidi ciclici; possiedono, pertanto, solo l'attività trans-

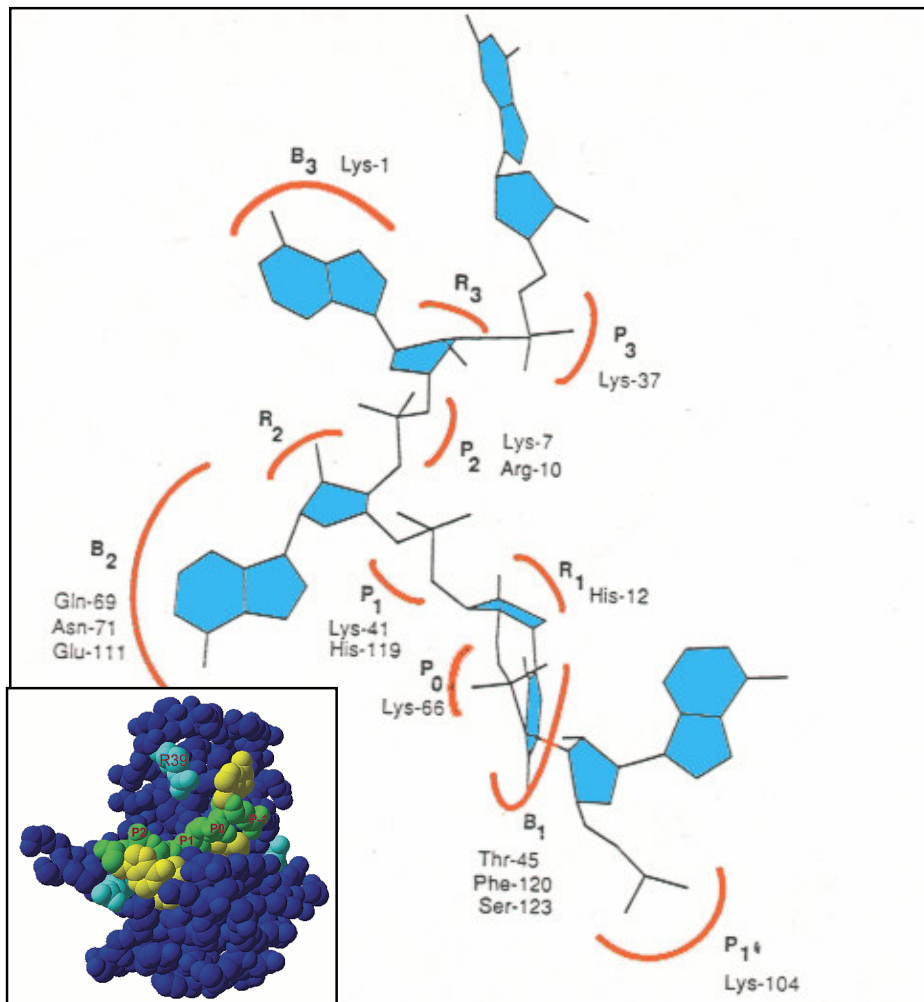


Fig. 3- Rappresentazione schematica del sito catalitico dell'RNasi A. Il sito attivo della RNasi A e di tutte le ribonucleasi pancreatiche dei mammiferi presenta una struttura detta a "sub-siti multipli". B, R, e P rappresentano i sub-siti che legano rispettivamente la base azotata, il ribosio e il gruppo fosfato. B1 è il sito specifico per le pirimidine mentre B2 per le purine. Il gruppo fosfato del legame fosfodiesterico idrolizzato dall'enzima si lega al sito P1 (Parès et al., 1991). In basso a sinistra è mostrata la struttura tridimensionale

esterasica. Anche nell'affinità per il substrato differiscono dalle ptRNasi, preferendo il poli(U) rispetto al poli(C). Le ribonucleasi appartenenti a questo gruppo erano in passato definite di tipo “non secretorio” ma tale denominazione appare impropria poiché, come tutte le altre RNasi della superfamiglia, sono proteine extracellulari sintetizzate in forma di precursori con un peptide segnale di 27 amminoacidi caratteristico di proteine secrete. Ribonucleasi di tipo non pancreatico sono state ritrovate nel fegato, nella milza, nella placenta e nei granuli degli eosinofili e sono anche conosciute come EDN (Eosinophil Derived Neurotoxin) ed ECP (Eosinophil Cationic Protein) in quanto isolate come neurotossine e solo successivamente caratterizzate come ribonucleasi (Hamann, K. J. et. al., 1989; Sorrentino, S., 1998; Sorrentino, S. et al., 1992).

La terza famiglia delle pt/nptRNasi, come è stato accennato sopra, comprende enzimi con caratteristiche strutturali e catalitiche “intermedie” rispetto alle ptRNasi e le nptRNasi. Infatti, da un punto di vista strutturale le ribonucleasi di questo gruppo sono più simili alle ptRNasi e come le ptRNasi sono in grado di idrolizzare i nucleotidi ciclici ma hanno un'affinità per il substrato più vicina a quella delle ribonucleasi di tipo non pancreatico. Inoltre, il pH ottimale per la loro azione catalitica risulta intermedio rispetto a quello degli altri due gruppi assumendo un valore di 7,5. I membri di questa famiglia sono evolutivamente molto conservati e presentano una identità di sequenza del 90% tra le diverse specie; ciò fa supporre che tali enzimi debbano svolgere un importante ruolo fisiologico non ancora scoperto (Sorrentino, 1998).

La quarta famiglia è rappresentata dalle RNasi-angiogenine (angRNasi). Le angiogenine hanno una bassa ma peculiare attività ribonucleasica (Shapiro

R. *et al.*, 1986) che risulta essere comunque essenziale per la loro funzione fisiologica che è quella di stimolare la formazione di nuovi vasi sanguigni (Shapiro *et al.* 1989); tale funzione le rende indispensabili per la crescita dei tumori solidi i quali hanno bisogno per accrescersi di una propria rete vascolare che ne assicuri un adeguato apporto di sangue. Per tale motivo le angiogenine sono state oggetto di studio quali possibile bersaglio anti-tumorale. L'azione dell'angiogenina umana (h-Ang) si esplica attraverso l'interazione con un recettore di circa 170 kDa presente sulla superficie delle cellule endoteliali (Hu, G. F. *et al.* 1997) che la trasloca nel nucleo (Moroianu, J. *et al.* 1994) dove stimola la sintesi dell'rRNA (Xu, Z.P. *et al.* 2002). La riduzione dell'attività enzimatica delle angRNasi è dovuta alla presenza di residui amminoacidici che ostacolano il corretto posizionamento della molecola di substrato nel sito attivo della proteina.

Il sito catalitico delle proteine dell'intera Superfamiglia, risulta essere essenzialmente costituito da due istidine e una lisina che nell'RNasi A corrispondono alle istidine 12 e 119 e alla lisina 41 (Raines, R., 1998). In base al meccanismo di reazione proposto (fig.4), l'istidina 12 funge da base strappando il protone all'ossigeno in 2' del ribosio dal lato 3' del legame suscettibile alla rottura; tale ossigeno, reso più nucleofilo dalla perdita dell'idrogenione, attacca l'atomo di fosforo del legame da tagliare; l'istidina 119 si comporta da acido donando il protone all'ossigeno in 5' del ribosio a valle del legame da rompere che in questo modo diventa un migliore gruppo uscente. La lisina 41, svolge un ruolo essenziale nella catalisi, in quanto stabilizza l'intermedio di transizione che ha la geometria di una bipyramide

trigonale, con i due atomi di ossigeno (2' di un ribosio e 5' dell'altro) ai vertici. Il prodotto di tale reazione è costituito da due frammenti di RNA di cui uno termina con il fosfato 2'-3' ciclico e l'altro con il 5'-OH. Le ribonucleasi di tipo pancreatico, inoltre, sono capaci di idrolizzare nucleotidi ciclici prodotti dalla reazione di transesterificazione (Raines, R., 1998) con una reazione nella quale His-14 e His-119 si scambiano i ruoli fungendo in questo caso la prima da acido e la seconda da base (fig.5).

Diverse altre famiglie di ribonucleasi sono state individuate in altri animali quali anfibi, rettili e uccelli ma mai nei pesci.

Il recente nuovo impulso allo studio di questi enzimi, deriva dalle loro particolari azioni biologiche; tra queste ribonucleasi, denominate RISBAse (Ribonucleases with Intrinsic Special Biological Actions) (D'Alessio G., 1993), troviamo una RNasi isolata da ovociti di *Rana pipiens* ad azione antitumorale chiamata per questo onconasi. Un'altra RNasi antitumorale è la ribonucleasi BS isolata dalle vescichette seminali bovine e possiede una peculiare caratteristica strutturale: si tratta di un dimero di due subunità identiche legate da due ponti disolfurici (Di Donato *et al.*, 1993). Altre due ribonucleasi, già accennate precedentemente, dotate di speciali attività biologiche (neurotossica ed elmintotossica) sono la nptRNasi 2 (EDN) e la nptRNasi 3 (ECP) isolate da granuli eosinofili umani e presenti anche nel fegato e nella milza; questi enzimi potrebbero essere coinvolti nella difesa dell'ospite grazie ad un'azione tossica nei confronti di elminti, batteri e virus.

Come accennato precedentemente, le ribonucleasi animali extracellulari sono state isolate da vari tessuti di molte specie diverse ma, sorprendentemente, non sono mai state individuate nei pesci, unica classe di

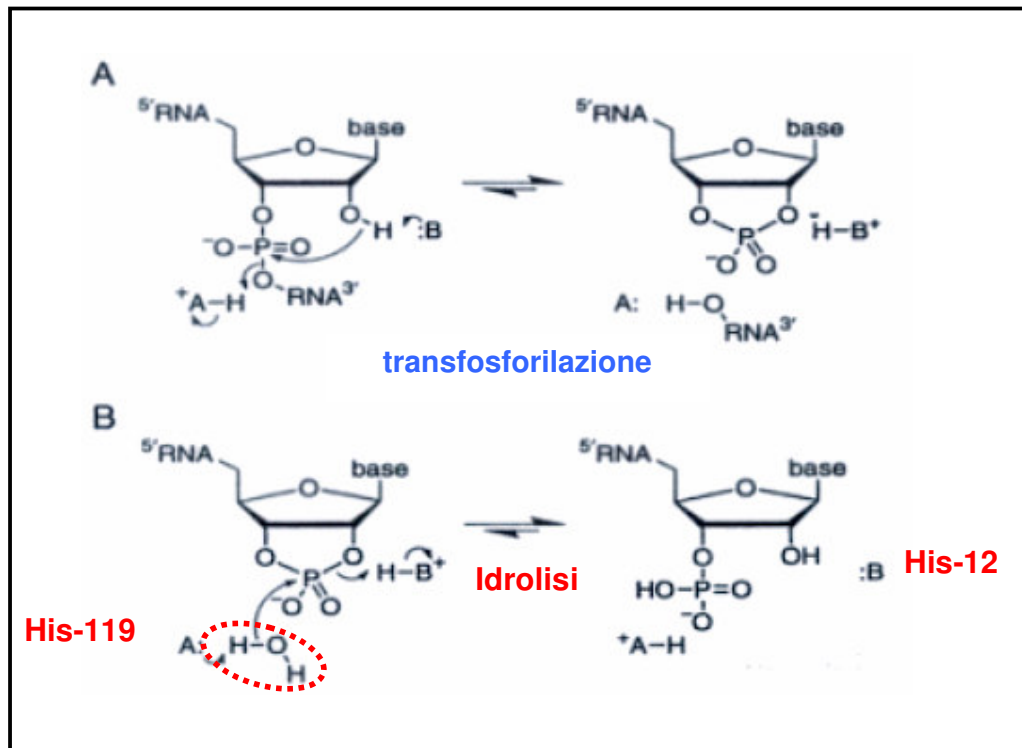


Figura 5-Le ribonucleasi di tipo pancreatico sono caratterizzate dalla capacità di idrolizzare i prodotti ciclici della reazione di transfosforilazione.

vertebrati in cui tale enzima sembrava essere assente nonostante la loro vicinanza evolutiva con i tetrapodi ed in special modo con gli anfibi. Pertanto, fino ad ora, si parlava di ribonucleasi dei tetrapodi.

La mappatura dell'intero genoma di *zebra-fish* (*Brachidanio rerio*), un piccolo pesce tropicale utilizzato negli studi di sviluppo embrionale, effettuata dal Sanger Institute (Cambridge, UK), ha permesso di individuare in tale organismo la presenza di tre sequenze genomiche codificanti caratterizzate da una significativa identità con l'RNasi A e una identità di sequenza ancora superiore con le angiogenine di mammifero (Tabella I). L'analisi della sequenza con BLAST, ha confermato l'omologia di sequenza con le RNasi dei tetrapodi e, in modo particolare, ha sottolineato la loro maggiore identità di sequenza con le angiogenine umane (Fig. 6).

Le proteine identificate in *zebra-fish* mostrano delle caratteristiche di sequenza interessanti (fig. 6): in esse, infatti, le regioni che consentono alla angiogenine di mammifero di esplicare la loro attività biologica sono solo parzialmente conservate come dimostra l'analisi condotta con ClustalW sulle suddette sequenze, che ha rilevato l'assenza dei residui chiave per l'attività angiogenica: N61-G62 e N109-G110. Sono invece conservati i residui che nelle ribonucleasi sono essenziali per la loro azione e cioè la triade catalitica costituita dalla His-12, His-119 e Lys-41 oltre al *consensus pattern* tipico della superfamiglia CKXXNTF. Tutte le ribonucleasi hanno quattro ponti disolfurici che stabilizzano la struttura tranne le angiogenine e le ribonucleasi isolate dagli anfibi, dai rettili e dagli uccelli che ne posseggono solo tre; anche tale caratteristica si ritrova nelle sequenze trovate in *zebra-fish* dove sono presenti solo sei cisteine ciò che rende possibile la formazione di tre ponti disolfurici.

% identità	RNasi A	ZF-RNasi 1	ZF-RNasi 2	ZF-RNasi 3	hAng
RNasi A	X	31,3	33,3	30,8	35,8
ZF-RNasi 1	31,3	X	55,4	42,4	35,4
ZF-RNasi 2	33,3	55,4	x	45,7	36,2
ZF-RNasi 3	30,8	42,4	45,7	X	36,2
hAng	35,8	35,4	36,2	36,2	X

Tabella I- Percentuali di identità tra ZF-RNasi 1, 2 e 3, hAng (angiogenina umana) e RNasi A (ribonucleasi pancreatica bovina).

ZF-RNasi 1	HVKERYKNFLNQHVGP---DMSVQRCNSEIGPN
ZF-RNasi 2	DNESPYEKFLRQHVDP---DMSVQKCNSEIS--
ZF-RNasi 3	EIRRRYEHFLTQHVG---GITEQTCDRVMR--
h-Ang	QDNSRYTHFLTQHYDAKPQGRDFRYCESIMR--

ZF-RNasi 1	NRKITLSGTDNGCKPVNTFILANKRLIKTV
ZF-RNasi 2	KRKITAK-AGNDCKKVNTFIQANKRDVNAV
ZF-RNasi 3	QRGITRFPTGNDCKEVNTFIQANGNHVRTV
h-Ang	RRGLTSP-----CKDINTFIHGNKRSIKAI

ZF-RNasi 1	CGRAGS--PQG-NMVRSNQFPVPVKCVLNN
ZF-RNasi 2	CGNAGNRVVDNLTLSNQPFPVVTCLKS
ZF-RNasi 3	CTGGGTRQTDNRDLYMSNNQFTVITCTLRS
h-Ang	CENKNGN-PHRENLRISKSSFQVTTCKLHG

ZF-RNasi 1	GERHPYCEYRGTRSTRYIVLKCEEGWPVHY
ZF-RNasi 2	GERRPHCQYRGRSSTRYIVLRCDKGWPVHY
ZF-RNasi 3	GERHPNCRYRGKESSRKIVVACEGEWPTHY
h-Ang	GSPWPPCQYRATAGFRNVVVACENGLPVLHL

ZF-RNasi 1	HEDEVNVG---
ZF-RNasi 2	DEGIIDVNSSG
ZF-RNasi 3	EKGVI---
h-Ang	DQSIFRRP

Figura 6- Allineamento multiplo delle tre RNasi da *zebra-fish* e l'angiogenina umana. In rosso sono evidenziati i residui chiave che hanno permesso di correlare queste sequenze a quelle delle RNasi appartenenti alla superfamiglia dei tetrapodi mentre in verde sono mostrati i residui considerati essenziali per l'attività angiogenica delle angiogenine dei mammiferi. Le sequenze codificanti RNasi da *zebrafish* sono state identificate dal dott. E. Pizzo utilizzando ENSEMBL genome database (<http://www.ensembl.org>) e la Washington University Zebrafish Genome resource (<http://zfish.wustl.edu>). La ricerca per omologia è stata effettuata attraverso BLAST (<http://www.expasy.org/tools/blast>)

Inoltre, nelle proteine di *zebra-fish*, alcuni residui amminoacidici caratteristici delle angiogenine di mammifero sono sostituiti da altri residui che farebbero ipotizzare un maggiore potere catalitico come ribonucleasi.

La verifica della capacità di tali proteine di funzionare come enzimi in grado di degradare l'RNA e al contempo di stimolare la crescita di nuovi vasi sanguigni, ha condotto all'identificazione di antenati delle angiogenine dei tetrapodi e di proteine capaci di fungere da ribonucleasi nei pesci.

MATERIALI E METODI

Ceppi batterici

***E. coli* ceppo BL21(DE3).** Il ceppo è stato acquistato dalla *AMS Biotechnology* ed utilizzato per effettuare l'espressione delle proteine ricombinanti. Nel genoma di tale ceppo è presente il gene per l'RNA polimerasi del batteriofago T7 che consente la trascrizione di sequenze clonate in vettori procariotici sotto il controllo del promotore di tale fago.

***E. coli* ceppo DH5a.** Il ceppo è stato acquistato dalla *AMS Biotechnology* ed utilizzato per l'amplificazione dei plasmidi.

Mezzi di coltura

LB (Luria-Bertani). Il mezzo di coltura liquido è stato preparato sciogliendo in acqua deionizzata 10g di triptone, 5g di estratto di lievito e 10g di cloruro di sodio per litro di terreno mentre il terreno solido è stato ottenuto dal mezzo liquido attraverso l'aggiunta di agar alla concentrazione finale di 1,5% quale agente gelificante (Joseph Sambrook, et al. 1982).

Antibiotici

L'**ampicillina** (Amp) è stata acquistata dalla Sigma e usata ad una concentrazione finale, nei mezzi di coltura, di 100 µg/ml.

Vettori

Vettore di espressione pET-22 b(+). Il vettore utilizzato per il clonaggio e l'espressione delle proteine ricombinanti contiene un gene per la resistenza all'ampicillina, un'origine di replicazione batterica, necessaria per la sua

propagazione nelle cellule di *E. coli*, il gene *lac I*, codificante per il repressore dell'operone del lattosio, e un *polilinker* clonato a valle del promotore di T7; all'interno del promotore è inoltre presente la sequenza *lac O* alla quale si lega il repressore (fig. 7). Il legame del repressore al promotore non consente l'attacco dell'RNA polimerasi impedendo dunque l'espressione dei geni clonati. Tale inibizione viene superata attraverso l'aggiunta di isopropil- β -D-tiogalattopiranoside (IPTG) al mezzo di coltura. L'IPTG è un analogo del galattosio non metabolizzabile dai batteri; una volta entrato nella cellula, esso si lega al repressore dell'operone del lattosio inducendone il distacco dal promotore del fago T7.

Culture cellulari

L'RNA totale utilizzato nei saggi di attività ribonucleasica è stato estratto da cellule umane HeLa, isolate da carcinoma della cervice uterina e fornite dalla *American Type Culture Collection* (ATTC).

Le cellule sono state coltivate alla temperatura di 37°C in presenza di CO₂ al 5% in *DMEM* (*Dulbecco's modified Eagle medium*) (Gibco), supplementato con penicillina, streptomycin e con siero fetale bovino (FBS) (Gibco) al 10%.

Preparazione dell' RNA totale da HeLa

Le cellule sono state lavate in *PBS* e lisate con il *TRIAGENT* (Sigma), utilizzando il protocollo descritto dalla casa produttrice per ottenere l'estrazione dell'RNA totale.

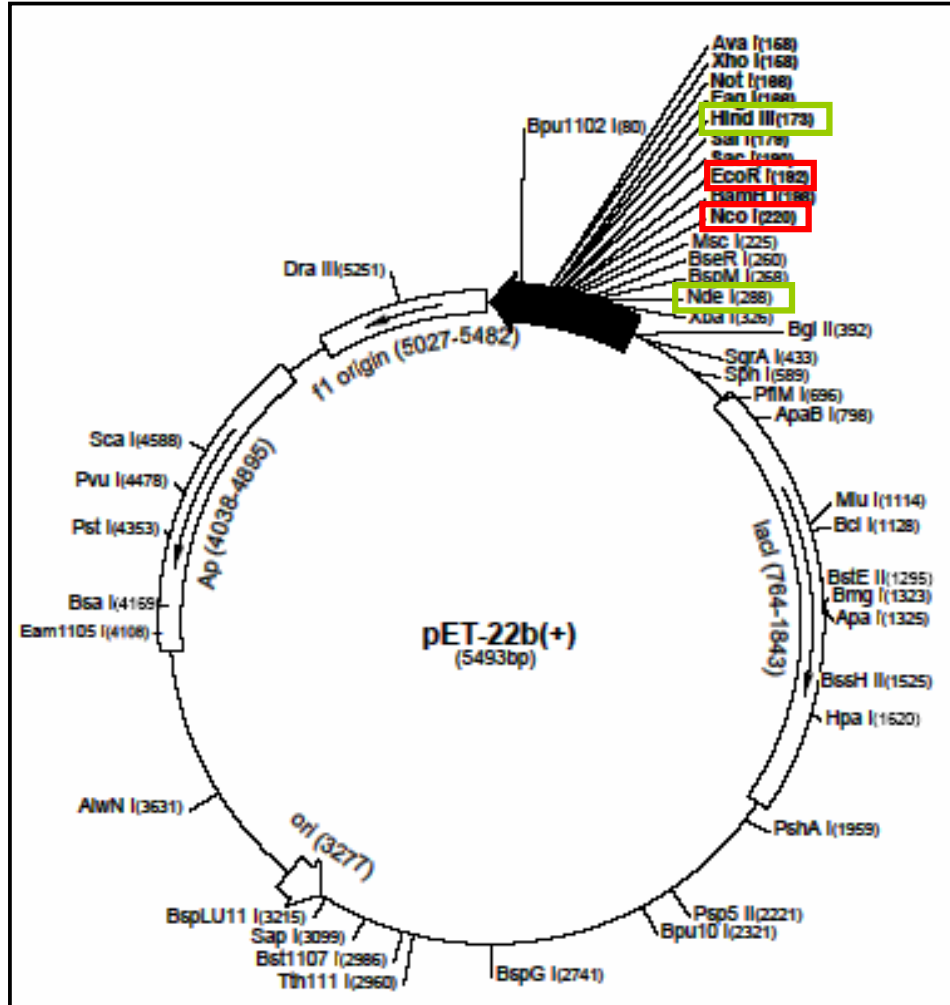


Figura 7 -Vettore di espressione pET 22 b(+). In figura è mostrato il gene per la resistenza all'ampicillina, l'origine di replicazione batterica, il gene *lac I*, il *polilinker* clonato a valle del promotore di T7. In rosso sono evidenziati i siti di restrizione utilizzati per il clonaggio di ZF-RNasi 1 e 3 e in verde quelli utilizzati per ZF-RNasi 2.

L'RNA estratto è stato risospeso in acqua trattata con DEPC (dietil-pirocarbonato) per eliminare eventuali tracce di ribonucleasi contaminanti e un'aliquota del campione è stata utilizzata per determinarne la concentrazione ed il grado di purezza mediante analisi spettrofotometrica.

Determinazione della concentrazione proteica

Per la determinazione della concentrazione delle proteine totali nei campioni in esame, è stato usato il reagente di *Bradford* (Sigma) secondo il protocollo fornito dalla casa produttrice. L'albumina di siero bovino (BSA) è stata utilizzata come proteina di riferimento per la costruzione di una retta di taratura. Tutte le determinazioni sono state effettuate in duplicato.

Inibitore delle proteasi

Complete, EDTA-free (Roche): inibitore ad ampio spettro di proteasi a serina e a cisteina utilizzato durante l'estrazione di proteine isolate da batteri.

Preparazione di cellule batteriche competenti

Per la preparazione di cellule batteriche competenti, una colonia è stata prelevata dopo una notte di crescita a 37°C su terreno solido e inoculata in 5mL di terreno liquido. Le cellule sono state incubate in agitazione a 37°C fino ad un valore di assorbanza a 600nm pari a 0,6 OD; quindi sono state centrifugate per 5 minuti a 3500 rpm a 4°C e risospese in 5ml di una soluzione di MgCl₂ 100mM freddo, centrifugate per 5 minuti a 3500 rpm a 4°C e risospese in 10ml di una soluzione di CaCl₂ 100mM freddo e infine incubate in ghiaccio per 60 minuti. I batteri sono stati nuovamente centrifugati nelle stesse

condizioni utilizzate in precedenza e il pellet è stato risospeso in 3ml di una soluzione di CaCl_2 85 mM e glicerolo al 15%. Aliquote di 100 μl di sospensione cellulare sono state trasferite in eppendorf sterili e conservate a -80°C .

Tutte le operazioni sono state condotte in condizioni di estrema sterilità.

Trasformazione batterica

Le cellule di *E. coli* competenti sono state trasformate utilizzando 20ng di plasmide per 100 μl di cellule competenti e poste in ghiaccio per 60 minuti. Sono state poi incubate a 42°C per 2 minuti e subito rimesse in ghiaccio.

Dopo l'aggiunta di 1ml di LB le cellule sono state incubate a 37°C per un'ora, quindi centrifugate per 3 minuti a 5000rpm. Dopo aver eliminato 1ml di sopranatante, il pellet ottenuto per centrifugazione è stato risospeso nel volume rimanente (circa 100 μl) e piastrato su LB-agar contenente ampicillina.

Analisi elettroforetica di acidi nucleici su gel d'agarosio

L'elettroforesi su gel di agarosio è stata utilizzata per la separazione e la determinazione del peso molecolare dei frammenti degli acidi nucleici e per i saggi di attività ribonucleasica. L'agarosio è stato sciolto nel tampone Tris-acetato 0,04M, 1mM EDTA, pH 8 (TAE 1X) al quale è stato aggiunto, alla temperatura di 60°C , bromuro di etidio alla concentrazione finale 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. I campioni sono stati caricati utilizzando il “loading buffer” 6x (blu di bromo-fenolo 0,25%; xilene-cianolo 0,25%, 30% glicerolo in acqua) e utilizzando come standard di peso molecolare il 2-Log o l'1Kb (Promega).

Reazione di polimerizzazione a catena (PCR)

Per l'amplificazione di ciascuna sequenza di cDNA è stata allestita una reazione di PCR con opportuni *primers* (MWG, Biotech AG) usando il kit *Fast Start High Fidelity PCR System* (Roche) (tabella II). Ciascuna reazione è stata effettuata in un volume totale di 50µl contenente i quattro deossiribonucleosidi trifosfato ad una concentrazione di 0,2mM, ciascun *primer* (*forward* e *reverse*) alla concentrazione di 1pmol/µl, 5µL di buffer di reazione 10X fornito dalla casa produttrice e 2,5 unità di enzima DNA Taq polimerasi High Fidelity; come stampo sono stati utilizzati 10ng di DNA.

Le amplificazioni sono state realizzate mediante una denaturazione iniziale dello stampo a 94°C per 5', seguita da 35 cicli termici ciascuno costituito da una fase di denaturazione di 30'' a 94°C, una fase di ibridazione di 30'' a 54°C ed una fase di sintesi di 1' a 72°C ; infine un ciclo di 7' a 72°C.

Il DNA amplificato è stato purificato con il *kit* Roche (*High Pure PCR Product Purification Kit*, Roche, IN, USA), secondo protocollo. Il DNA purificato è stato quindi analizzato su gel di agarosio 1%. Le reazioni descritte sono state condotte con lo strumento *Gene Amp PCR System 9700* (Applied Biosystem).

OLIGONUCLEOTIDE	T _m (°C)	lunghezza	CARATTERISTICHE
Oligo ZF1_ forward 5'ggaattccat <u>atg</u> catgtaaagga gcgt3'	65	27 mer	Inserisce al 5' della sequenza di interesse il sito di restrizione per l'enzima NdeI (sottolineato)
Oligo ZF1_ reverse1 5'cgacgttgacttcgtcttcataata atgcacaggccatccttcc3'	>75	44 mer	Inserisce al 3' della sequenza di interesse quattro residui mancanti all'estremità C- terminale nella sequenza del cDNA di ZF1
Oligo ZF1_ reverse2 5'cccaagc <u>tta</u> tccgacgttgacttc gtcttcataataatgca3'	72,4	42 mer	Inserisce al 3' della sequenza di interesse il sito di restrizione per l'enzima Hind III (sottolineato) e un codone di stop mostrato in rosso e 1 residuo al C-terminale mancante nella sequenza del cDNA di ZF1
Oligo ZF2_ forward 5'gttaagcc <u>atg</u> gataatgagtcct cttatg3'	70	30 mer	Inserisce al 5' della sequenza di interesse il sito di restrizione per l'enzima NcoI (sottolineato)
Oligo ZF2_ reverse 5'gagaaagaattc <u>tta</u> gcctgagct gtttaca3'	>75	31 mer	Inserisce al 3' della sequenza di interesse il sito di restrizione per l'enzima EcoRI (sottolineato) e un codone di stop mostrato in rosso
Oligo ZF3_ forward 5'ggaattccat <u>atg</u> gaaataaggcg ccgt3'	67	28mer	Inserisce al 5' della sequenza di interesse il sito di restrizione per l'enzima NdeI (sottolineato)
Oligo ZF3_ reverse 5'cccaagc <u>tta</u> aataacacctttttc atagt3'	68	30 mer	Inserisce al 3' della sequenza di interesse il sito di restrizione per l'enzima Hind III e un codone di stop mostrato in rosso

Tabella II- *Primers* utilizzati per le reazioni di PCR.

Tecniche di clonaggio

Tutti gli enzimi di restrizione ed i relativi tamponi sono stati acquistati dalla Novagen, Madison, WI, USA ed utilizzati secondo i dettagli sperimentali indicati dalle case produttrici.

I cDNA di zf-RNasi 1 e 3 sono stati amplificati mediante *PCR* e digeriti utilizzando gli enzimi di restrizione NdeI ed HindIII, mentre per zf-RNasi 2 sono stati utilizzati gli enzimi NcoI e EcoRI. Per ogni digestione sono stati utilizzati 3 unità di enzima di restrizione per microgrammo di DNA. Dopo digestione enzimatica, a 37°C *over night*, i frammenti sono stati analizzati e purificati, secondo protocollo, da gel d'agarosio *low melting* 1% (Gaur et al., 2001) utilizzando il kit *QIAquick PCR Purification Kits* (Qiagen) e quindi clonati nel vettore d'espressione pET-22b(+). Tale vettore è stato preventivamente digerito con gli stessi enzimi di restrizione utilizzati per ciascun cDNA. La linearizzazione del vettore è stata verificata su gel di agarosio all'1% su cui è stata visualizzata un'unica banda corrispondente a 3500 bp. Sono stati defosforilati 150ng di plasmide digerito utilizzando 1U di *SAP (Alcaline Phosphatase Shrimp)* (Roche) per 10' a 37°C. L'enzima è stato poi inattivato lasciando la miscela di reazione per 15' a 65°C. E' stata quindi effettuata un'estrazione con un volume di fenolo:cloroformio:alcool isoamilico nel rapporto volumetrico di 24:25:1. Il DNA è stato quindi sottoposto a precipitazione in etanolo e risospeso in acqua. Sono state allestite due reazioni di *ligation* con T4 DNA ligasi utilizzando due diversi rapporti molari vettore:inserto e cioè 1:4 e 1:10. Il rapporto molare ottimale tra vettore e inserto è risultato essere 1:4. La reazione di *ligation* è stata effettuata utilizzando la T4 DNA ligasi e il *buffer* 10X della Roche seguendo il

protocollo della ditta. La miscela di reazione della ligasi è stata utilizzata per trasformare cellule di *E. coli* del ceppo DH5a. Le colonie trasformate ottenute, sono state cresciute singolarmente in terreno liquido contenente ampicillina e il DNA plasmidico è stato estratto con il *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Quiagen). La presenza nel vettore ricombinante dei cDNA clonati è stata analizzata mediante *PCR* sui singoli cloni utilizzando l'oligo T7PP (5'TAATACGACTCACTATAGGG3') e l'oligoT7TP (5'GCTAGTTATTGCTCAGCGG3') che ibridano rispettivamente a monte e a valle del *polylinker*. L'enzima utilizzato è stato la Taq polimerasi del sistema *Fast Start Taq DNA polimerase* (Roche) e le condizioni di reazione sono analoghe a quelle descritte precedentemente.

I prodotti della *PCR* sono stati quindi analizzati su gel di agarosio all'1% e si sono rivelati del peso molecolare atteso; la conferma del clonaggio dei due cDNA è stata ottenuta mediante sequenziamento del DNA effettuata dalla MWG secondo metodo Sanger.

Espressione in cellule procariotiche

I plasmidi contenenti i cDNA di zf-RNasi1, 2 e 3 sono stati utilizzati per trasformare cellule competenti di *E. coli* del ceppo BL21(DE3). E' stato effettuato un inoculo di 1 colonia di cellule trasformate in 50 ml di LB contenente ampicillina (100µg/ml) e lasciato in agitazione a 37°C *over night*. L'inoculo è stato versato in 1L di LB-ampicillina e lasciato crescere in agitazione a 37°C monitorando la crescita per via spettrofotometrica misurando l'assorbanza a 600nm. L'espressione è stata indotta aggiungendo 2ml di isopropil-β-D-tiogalattopiranoside (IPTG) 0,1 M per litro di coltura, quando la

crescita ha raggiunto un valore di $OD_{600nm} \approx 1$. Prima dell'aggiunta dell'induttore, è stato prelevato 1ml di cellule, centrifugato a 6000rpm per 15' a 4 °C e risospeso in 50µl di *cracking buffer* 2X (100mM Tris-HCl pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerolo). Dopo una notte di crescita è stato prelevato 1mL di cellule indotte, centrifugato a 6000rpm per 15' a 4 °C e risospeso in 50µl di *cracking buffer* 2X. Queste aliquote sono servite per controllare l'espressione delle proteine ricombinanti su gel di poliacrilammide al 15%. Dopo verifica dell'espressione, le cellule batteriche sono state centrifugate a 6000 rpm per 20' a 4°C. Il pellet batterico è stato lavato due volte in 20ml di Tris-HCl 50mM pH 7,4, EDTA 20mM e centrifugato a 6000 rpm per 15' a 4°C e quindi risospeso in 20ml di Tris HCl 0,1M pH 7,4, EDTA 5mM e di nuovo centrifugato a 6000 rpm per 15' a 4°C. Il pellet è stato poi risospeso in 20ml di Tris HCl 0,1M pH 7,4, EDTA 1mM, in presenza di inibitori delle proteasi (*PMSF*) *EDTA free* (Roche). La sospensione batterica è stata trasferita in tubi da centrifuga da 35ml e sonicata per 10' effettivi (20'totali) 30''*on* e 30''*off* con *Ultrasonic sonicator* (*Heat System Ultrasonic*) ad una potenza di 20kHz. Il lisato cellulare è stato centrifugato a 12000rpm per 1h a 4°C. Analisi mediante *SDS-PAGE* hanno rivelato che le RNasi da *zebrafish* erano completamente sequestrate nei corpi di inclusione perciò si è proceduto al recupero della proteina da questi ultimi. I corpi di inclusione sono stati dunque lavati due volte risospingendoli in 20ml di Urea 2M, TritonX 100 2%, TrisHCl 0,1M pH 7,4, EDTA 5mM e sonicandoli ciascuna volta per 2' effettivi (4' totali) 30''*on* e 30''*off* ad una potenza di 20kHz e centrifugati a 12000 rpm per 20' a 4°C. Il pellet è stato lavato con 20ml di TrisHCl 0,1M pH 7,4, EDTA 5mM e centrifugato a 12000rpm per 20' a 4°C.

Per la denaturazione, il pellet è stato risospeso in 10ml di Guanidina HCl 7M, Tris HCl 0,1M pH 7,4 e sonicato per 10' effettivi (20'totali) 30''*on* e 30''*off* come precedentemente descritto. Alla soluzione di denaturazione sono stati aggiunti anche 70 μ l di β -mercaptoetanol (7 μ l per millilitro di sospensione) ed è stata effettuata un' incubazione di 3h a 37°C, in agitazione, fino alla completa risospensione del pellet. La sospensione è stata aggiunta goccia a goccia a 50 volumi (500mL) di soluzione di rinaturazione (TrisHCl 50mM pH7,4) preraffreddata a 4°C e lasciata rinaturare a 4°C *over night*. La soluzione di rinaturazione è stata centrifugata a 14000 rpm per 1h a 4°C. Il surnatante, contenente la proteina ricombinante è stato filtrato con filtri da 0,45 μ m e conservato a 4°C per essere poi sottoposto a purificazione mediante metodi cromatografici. Ad ogni passaggio della purificazione è stata prelevata un'aliquota di pellet e di surnatante ed è stata analizzata mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide al 15% in *SDS* eseguita secondo il metodo di *Laemmli* (*Laemmli et al.*, 1970) per seguire il destino delle proteine ricombinanti. Come riferimento è stato utilizzato il *marker colorburst electrophoresis* (SIGMA) e successivamente è stata effettuata una colorazione con blu di Coomassie.

Colorazione con colorante blu di Coomassie. Il gel è stato colorato mediante immersione per 30 minuti in una soluzione contenente isopropanolo al 20%, acido acetico al 10% e il colorante blu di *Coomassie* alla concentrazione finale dello 0,1%. Il gel è stato poi decolorato con una soluzione di alcool etilico al 20% e acido acetico al 7%.

Colorazione per attività ribonucleasica.

Dopo la corsa elettroforetica, il gel è stato immerso per 30' in una soluzione di isopropanolo al 25% in Tris-HCl 0,01M pH 7,4 sotto agitazione a temperatura ambiente e successivamente lavato con Tris-HCl 0,01M, pH 7,4 nelle medesime condizioni. Il gel è stato posto dunque in una soluzione di Tris-HCl 0,1M pH 7,4 contenente RNA da lievito tipo VI (SIGMA) 4mg/mL per 15' a 37°C, in agitazione e quindi lavato con Tris-HCl 0,01M pH 7,4 per 10' a temperatura ambiente, sotto agitazione. Infine si è proceduto alla colorazione con una soluzione contenente Tris-HCl 0,01M pH 7,4, blu di toluidina 0,2% per altri 10' a temperatura ambiente e decolorato con una soluzione di Tris-HCl 0,01M pH 7,4 .

Al termine del saggio le bande proteiche contenenti attività ribonucleasica appaiono bianche su fondo blu. (Blank A et al., 1982)

Tecniche cromatografiche

Le tre ribonucleasi da *zebrafish* sono state purificate eseguendo una cromatografia a scambio ionico seguita da una cromatografia a fase inversa.

Cromatografia a scambio ionico : è stata eseguita sul sistema *Akta Purifier* (Amersham Biosciences) utilizzando la colonna a scambio cationico *Resource S* (Amersham Biosciences). Le proteine in analisi sono state caricate su tale colonna, equilibrata con tampone A (Tris HCl 50 mM pH 7,4), ed eluite applicando il seguente schema di eluizione ad un flusso pari ad 1ml/min :

- 0 - 10% tampone (TrisHCl 50mM pH 7,4, NaCl 1M) in 5'
- isocratica al 10% tampone B per 30'
- 10 - 100% tampone B (TrisHCl 50mM pH 7,4, NaCl 1M) in 30'

In tal modo si viene a creare un gradiente di forza ionica nella fase mobile che consente il distacco differenziale delle proteine legate alla colonna in base alla loro carica. Le frazioni contenenti le proteine di interesse, non essendo ancora omogenee, sono state sottoposte ad un'ulteriore cromatografia a fase inversa.

Cromatografia a fase inversa : è stata effettuata su una colonna *Resource RPC* (Amersham Biosciences). Il campione in analisi, una volta caricato sulla colonna equilibrata con il tampone A (acetonitrile 5% contenente acido trifluoroacetico (TFA) 0,1% (v/v)) è stato eluito secondo il seguente gradiente lineare:

- 5-60% tampone B (acetonitrile 90% contenente TFA 0,1% (v/v)) in 60' ad un flusso di 1mL/min.

Saggi di precipitazione con RNA da lievito

Per la caratterizzazione funzionale parziale delle tre proteine ricombinanti, è stato utilizzato un saggio di precipitazione che permette di mettere in evidenza una eventuale attività ribonucleasica utilizzando come substrato l'RNA totale estratto da cellule di lievito.

In tale saggio quantità variabili tra 500ng e 5µg delle proteine ricombinanti sono state incubate per 2 ore a 37°C in un tampone di Hepes•NaOH 330mM pH 7,0, NaCl 330mM, BSA (albumina di siero bovino) 0,1mg/mL, RNA totale di lievito 2mg/mL. Alla fine dell'incubazione, l'RNA polimerico è stato precipitato mediante l'aggiunta di 700µL di acido perclorico 7,1%, uranil acetato 0,178% mentre l'RNA degradato è rimasto in soluzione.

Il precipitato è stato allontanato per centrifugazione a 14000rpm per 15' a 4°C e si è misurato l'assorbimento a 260nm di una diluizione 1:10 del surnatante. Le attività specifiche sono state calcolate utilizzando la formula:

$$\text{Attività specifica} = \frac{\Delta A \times 1000}{\text{mg di proteina}}$$

dove ΔA rappresenta la differenza di assorbimento tra il campione e il bianco.

Saggi di attività ribonucleasica su RNA da cellule HeLa

I saggi di attività ribonucleasica su RNA totale estratto da cellule HeLa permettono di mettere in evidenza su gel d'agarosio la degradazione dell'rRNA. Ciascuna proteina (RNasi A, hAng, ZF-RNasi 1,2 e 3) è stata incubata con 4µg di rRNA, a 37°C per 20' e la reazione è stata quindi bloccata mediante l'aggiunta di *loading buffer* 6X (blu di bromofenolo 0,25%, xilene cianolo contenente 0,25%, saccarosio 40%) e 0,2% DEPC (dietilpirocarbonato). La miscela di reazione è stata dunque caricata su gel d'agarosio al 1,2% e sottoposta ad elettroforesi. Tutte le reazioni sono state allestite in un volume finale di 20 µL contenente 10mM DTT (ditiotreitolo), 125mM NaCl, 1mM EDTA, 20mM Hepes•NaOH pH 7 (Raines et al. 1998). Sono state saggiate 10 pmol di ciascuna proteina ricombinante e 1 pmol di RNasi A in presenza e in assenza di cRI in un rapporto molare proteina:inibitore pari a 1:1.

Determinazione di parametri cinetici attraverso saggi fluorimetrici

Per effettuare il saggio è stato utilizzato un substrato fluorescente 6-FAM-dArUdAdA-6-TAMRA costituito da un singolo ribonucleotide intercalato in una serie di tre deossiribonucleotidi. All'estremità 5' del substrato, è legata una molecola di 6 carbossifluoresceina (6-FAM) mentre all'estremità 3' è legata una molecola di 6-carbossitetrametilrodamina (6-TAMRA) (fig. 8). La fluoresceina emette luce ad una lunghezza d'onda pari a 515nm quando viene eccitata da luce a 490nm. Se il substrato è intatto si ha il *quenching* della fluorescenza ad opera della rodamina. Quando il substrato viene tagliato, la rodamina si allontana dalla fluoresceina che riacquista così la capacità di assorbire ed emettere luce. Per il saggio di attività ribonucleasica è stata allestita una reazione di 500µl in MES-NaOH 0,1M pH 6 NaCl 0,1M in presenza del substrato fluorescente 20-80nM. Per essere sicuri che né la cuvetta né il tampone fossero contaminati da ribonucleasi esogene, si è registrata la fluorescenza della miscela di reazione parziale per circa 5' prima dell'aggiunta dell'enzima e si è atteso che la linea di base si stabilizzasse. Dopo l'aggiunta dell'enzima è stata registrata la luce emessa dal substrato a 515nm.

Sono state saggiate le tre ZF-RNasi in concentrazioni variabili tra 5µM e 50µM, l' RNasi A tra 1 e 200 pM e l'angiogenina umana tra 0,130 e 0,50 µM.

Il valore di k_{cat}/K_M è stato calcolato mediante la seguente relazione:

$$k_{cat}/K_M = \frac{\Delta F / \Delta t}{F_{max} - F_0} \cdot \frac{1}{[E]}$$

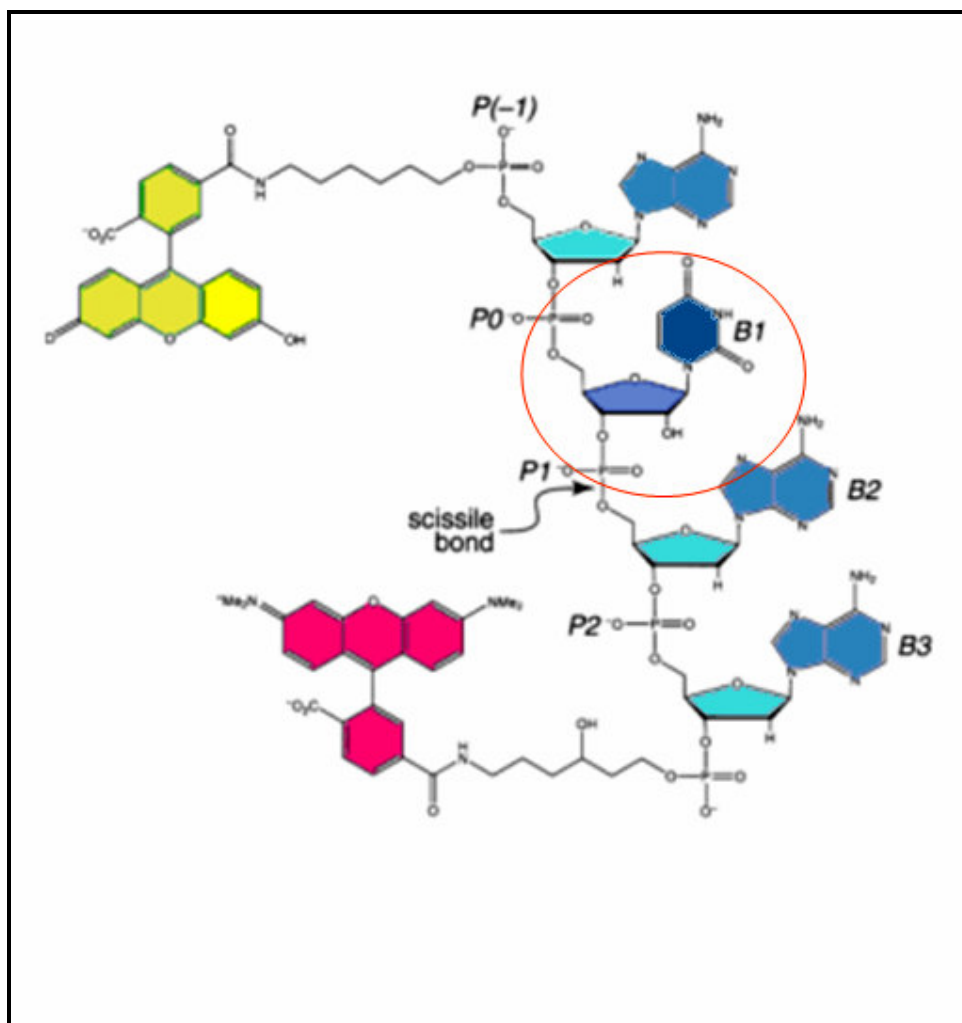


Figura 8 -Struttura chimica del substrato sintetico utilizzato nella determinazione dei parametri cinetici mediante lo spettrofluorimetro. In giallo è evidenziata al 5' la 6 carbossifluoresceina (6-FAM) mentre all'estremità 3', in fucsia, è legata una molecola di 6-carbossitetrametilrodamina (6-TAMRA). Sono indicati anche subsiti di legame dell'RNasi A ai gruppi fosfato (P0,P1,P2) e alle basi azotate (B1,B2,B3).L' uridina è evidenziata in rosso.

dove $\Delta F/\Delta t$ è la pendenza della regressione lineare della curva, F_{\max} rappresenta l'intensità massima di fluorescenza dopo l'aggiunta, al termine del saggio, di una quantità di RNasi A (~0,1 μM finale) tale da degradare tutto il substrato; F_0 è invece la fluorescenza registrata prima dell'aggiunta dell'enzima ed infine $[E]$ rappresenta la concentrazione molare degli enzimi utilizzati.

Ogni saggio è stato effettuato in duplicato.

Saggi di attività angiogenica

Per i saggi di attività angiogenica (in collaborazione con il dott. S. De Falco) sono state utilizzate cellule HUVEC (Cambrex), cresciute nel mezzo EBM-2 (endothelial basal medium) con l'aggiunta di fattori di crescita (EGM-2 bullet kit, Cambrex). Nel saggio viene utilizzata una piastra da 24 pozzetti che vengono rivestiti ciascuno con 230 μL di Matrigel per 30' a 37°C; in ogni pozzetto vengono piastrati 500 μL di sospensione cellulare (8×10^4 cellule) in EBM-2 contenente l'angiogenina umana o una delle tre ZF-RNasi in concentrazione pari a 200ng/mL.

Cellule cresciute nel terreno di coltura completo dei fattori di crescita EGM-2 e nel terreno basale mancante di tali fattori EBM-2 sono state utilizzate rispettivamente come controllo positivo e controllo negativo.

Al termine della crescita, le cellule sono state fissate con PBS contenente glutaraldeide 0.2%, paraformaldeide 1% e sono state quindi fotografate. Ciascun saggio è stato eseguito in duplicato.

RISULTATI

Produzione delle RNasi ricombinanti da *zebra-fish*

Le sequenze dei tre geni codificanti le RNasi da *zebra-fish*, sono state isolate mediante *PCR* da due diverse librerie di cDNA:

- *RZPD* (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH) disponibile nel web all'indirizzo www.rzpd.de) per ZF-RNasi 1 e 2.
- Una libreria di cDNA in un vettore della serie lambda ZAP ottenuta dalla dott.ssa Quarto presso la Stanford University per ZF-RNasi 3.

Dal confronto col DNA genomico di *zebra-fish*, la sequenza del cDNA di ZF-RNasi 1 risultava mancante di cinque residui al C-terminale perciò sono state effettuate due reazioni di PCR per completarla. Nella prima reazione sono stati aggiunti i primi quattro residui utilizzando l'oligo ZF1 *reverse* 1 e l'oligo ZF1 *forward* che ha inserito all'estremità 5' il sito di restrizione per NdeI. Nella seconda reazione è stato aggiunto il quinto residuo, il sito di restrizione per Hind III al terminale 3' e il codone di stop utilizzando ancora una volta l'oligo ZF1 *forward* e l'oligo ZF1 *reverse* 2. Il cDNA di ZF-RNasi 2, invece, è stato amplificato utilizzando l'oligo ZF2 *forward* che ha inserito il sito di restrizione per NcoI all'estremità 5' e l'oligo ZF2 *reverse* che ha inserito all'estremità 3' il sito di restrizione per EcoRI e il codone di stop (Materiali e Metodi); analogamente per ZF-RNasi 3 sono state utilizzati gli oligo ZF3 *forward* e ZF3 *reverse* per amplificare le sequenze e contemporaneamente inserire il codone di stop e i siti di restrizione per NdeI e HindIII. L'analisi per elettroforesi su gel di agarosio 1% ha rivelato che i prodotti di amplificazione erano della lunghezza attesa. I frammenti ottenuti da tale amplificazione sono

stati tagliati con i relativi enzimi di restrizione per il clonaggio nel plasmide pET22-b(+) (Materiali e Metodi). I cloni ottenuti sono stati sottoposti ad analisi di restrizione e mediante *PCR*, utilizzando l'oligo T7PP (5'TAATACGACTCACTATAGGG3') e l'oligo T7TP (5'GCTAGTTATTGC TCAGCGG3') che si appaiano rispettivamente a monte e a valle del *polylinker*, per verificare l'inserimento del DNA di interesse nel vettore di espressione.

Il DNA plasmidico dei diversi cloni positivi isolati è stato inoltre sottoposto ad analisi di sequenza (MWG Biotech, Firenze, Italia) prima di essere utilizzato per la produzione delle proteine ricombinanti in cellule di *E.coli* del ceppo BL21(DE3).

Per ottimizzare i livelli di espressione, sono state condotte alcune prove variando parametri critici quali la temperatura e la durata dell'induzione. La temperatura ottimale è risultata essere di 37°C. Livelli massimi di espressione sono stati ottenuti prolungando l'induzione *over-night* dopo che la coltura batterica aveva raggiunto un valore di assorbanza pari 1 OD_{600nm}.

L'analisi mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide al 15% in presenza di SDS ha evidenziato inoltre che le tre proteine ricombinanti avevano una mobilità elettroforetica compatibile con il peso molecolare atteso e si ritrovavano esclusivamente nei corpi di inclusione. Pertanto è stato necessario recuperarle dai corpi di inclusione attraverso una fase di denaturazione e una successiva rinaturazione. La soluzione di rinaturazione, contenente la proteina di interesse, è stata sottoposta ad una cromatografia a scambio cationico per una prima purificazione da specie contaminanti.

In figura 11 è riportato il cromatogramma relativo alla ZF-RNasi 1. I profili cromatografici di ZF-RNasi 2 e 3 sono del tutto analoghi a quello

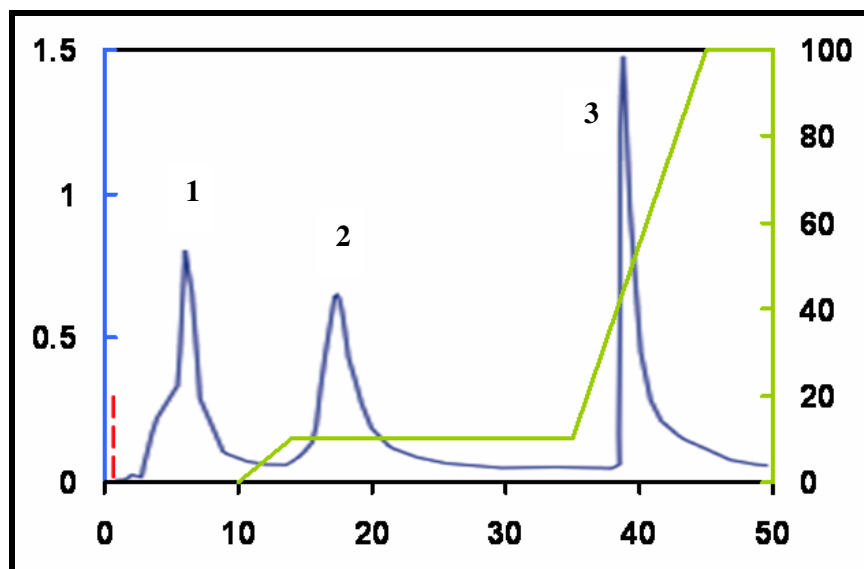
riportato e per questo omessi. La proteina di interesse è stata eluita al 37% del tampone B e le relative frazioni sono state analizzate per *SDS-PAGE* (fig. 9). La presenza di specie contaminanti a diverso peso molecolare ha reso necessaria una ulteriore purificazione attraverso *RP-HPLC* (*reverse phase high pressure liquid chromatography*). Anche in questo caso i profili cromatografici delle tre proteine coincidono e per tale ragione sono stati riportati in figura 10 solamente i dati relativi a ZF-RNasi 1. La proteina è stata eluita al 25% del tampone B. Nella figura sono mostrati i risultati dell'analisi elettroforetica mediante *SDS-PAGE* del picco maggioritario dalla quale è possibile verificare la purezza delle preparazioni proteiche (fig. 10).

Attività ribonucleasica delle tre proteine ricombinanti.

L'attività enzimatica delle tre proteine purificate è stata saggiata, in prima analisi, attraverso uno zimogramma. Sono stati caricati su gel di poliacrilammide al 15%, in presenza di SDS, 70ng di RNasiA e 10 µg di ciascuna proteina. Lo zimogramma eseguito sulle tre proteine mostra che esse hanno una attività ribonucleasica molto bassa come si evidenzia dal confronto con l'RNasi A ma comunque comparabile all'attività mostrata dall'angiogenina umana (fig.11).

Questi risultati sono stati confermati dall'analisi effettuata mediante saggi di degradazione di RNA da lievito che hanno permesso di determinarne l'attività specifica. Come è mostrato in tabella III, le RNasi da pesci hanno una

a)



b)

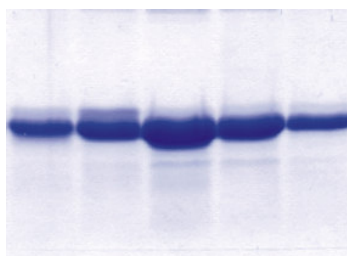


Figura 9- a) Cromatografia a scambio cationico sulla soluzione di rinaturazione del lisato dei corpi di inclusione di ZF-RNasi 1. Il picco 3 contiene la proteina di interesse. I profili cromatografici di ZF-RNasi 2 e 3 sono del tutto analoghi a quello riportato e per questo omessi.
b) SDS-PAGE al 15% delle frazioni del picco 3. La proteina non risulta ancora pura.

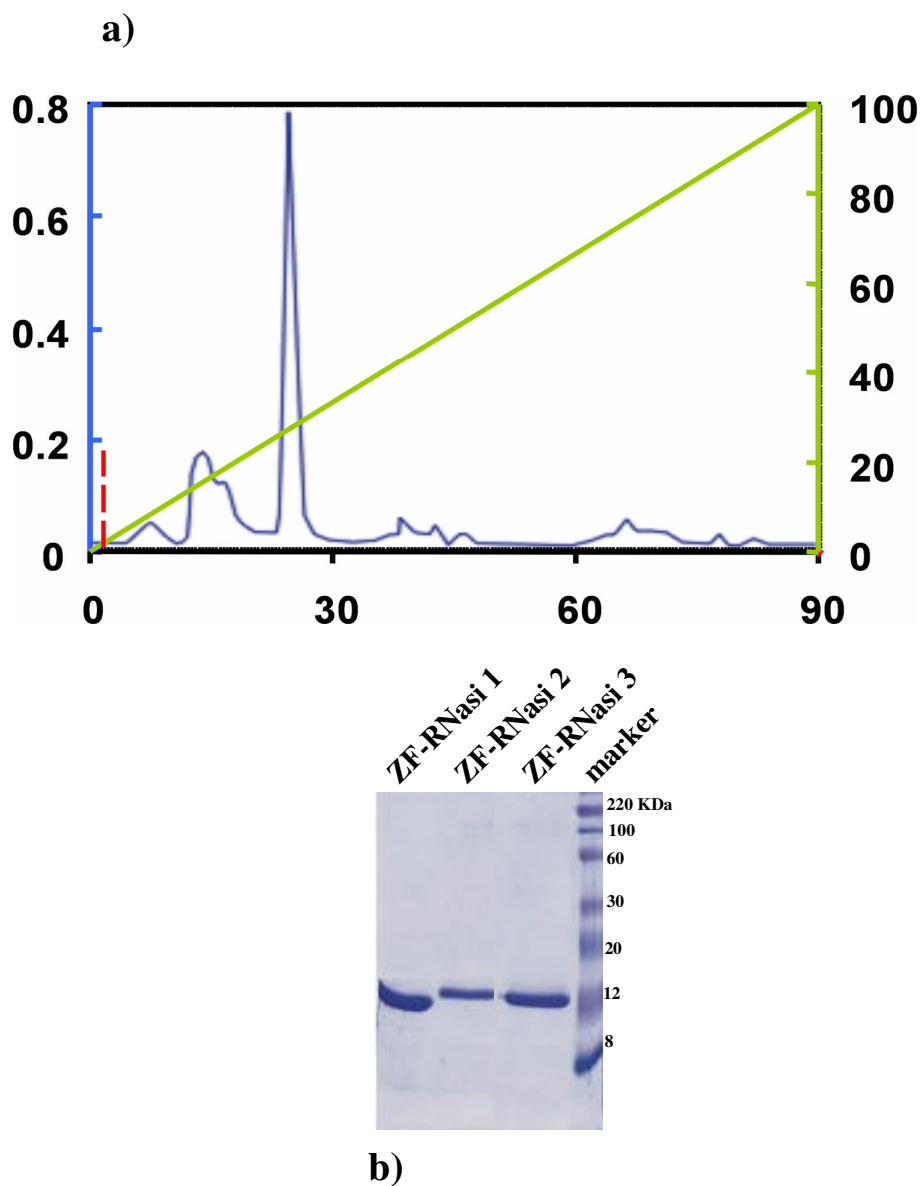


Figura 10- a) Profilo cromatografico dell'RP-HPLC eseguita sulle frazioni della cromatografia a scambio cationico contenenti ZF-RNasi 1; il picco maggioritario rappresenta la proteina di interesse. I profili cromatografici di ZF-RNasi 2 e 3 sono del tutto analoghi a quello riportato e per questo omessi. b) SDS-PAGE al 15% delle tre proteine codificanti le RNasi da *zebra-fish* dopo l'ultimo passaggio di purificazione attraverso RP-HPLC. Dal gel è possibile apprezzare la purezza e l'omogeneità delle preparazioni proteiche.

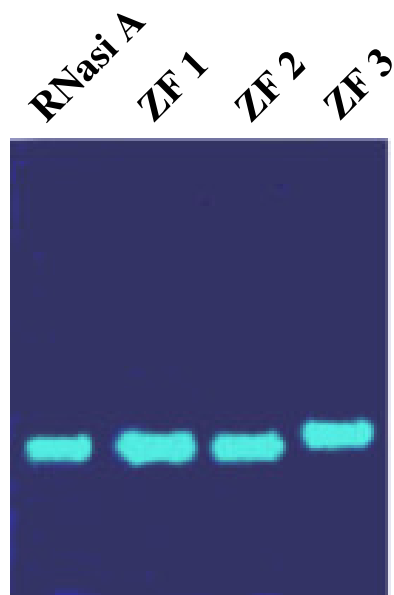


Figura 11- Zimogramma delle tre proteine ricombinanti. Come controllo positivo del saggio è stata utilizzata l’RNasi A

Enzima	Attività specifica	% Attività
RNasi A	76.000	100
ZF-RNasi 1	42	0.055
ZF-RNasi 2	139	0,18
ZF-RNasi 3	1.65	0.0021
hAng	16.4	0.021

Tabella III- Attività specifiche delle tre ZF-RNasi determinate mediante saggi di degradazione di RNA da lievito. Tali valori sono messi a confronto con le attività specifiche dell’RNasi A e dell’hAng.

attività specifica comparabile a quella dell'angiogenina umana ma, tale attività, è estremamente più bassa di quella che presenta l'RNasi A.

In particolare ZF-RNasi 2 è risultata essere la più attiva ed è circa 500 volte meno attiva dell' RNasi A.

I bassi valori di attività specifica, mostrati dalle tre ZF-RNasi, potrebbero essere dovuti alle loro peculiari caratteristiche strutturali più simili a quelle dell'angiogenina umana che a quelle dell'RNasi A. Infatti, le angiogenine dei mammiferi, alle quali le ZF-RNasi sono strettamente correlate, (35% di identità di sequenza e tre ponti disolfurici), mostrano una modestissima e insolita attività ribonucleasica (Shapiro, R. *et al.* 1986).

Inoltre, considerando che le ribonucleasi hanno una notevole capacità di riacquistare la loro struttura nativa spontaneamente e reversibilmente, al 90 - 100% per semplice rimozione dell'agente denaturante, sembra improbabile che la bassa attività catalitica delle tre ZF-RNasi possa essere imputabile ad un *folding* non corretto durante le fasi di rinaturazione.

Saggi di attività ribonucleasica su RNA da cellule Hela.

Questo saggio ha permesso di mettere in evidenza la capacità delle tre ZF-RNasi di degradare l'rRNA estratto da cellule HeLa. Inoltre è stato possibile valutare l'influenza dell'inibitore citosolico delle ribonucleasi (cRI) sull'attività enzimatica delle tre proteine ricombinanti. Il cRI è una molecola di 50kDa a forma di ferro di cavallo che cattura le RNasi nel suo solco rendendole così inattive (fig. 12). In figura 13 è riportata l'immagine della corsa elettroforetica su gel d'agarosio attraverso la quale è stato possibile valutare il

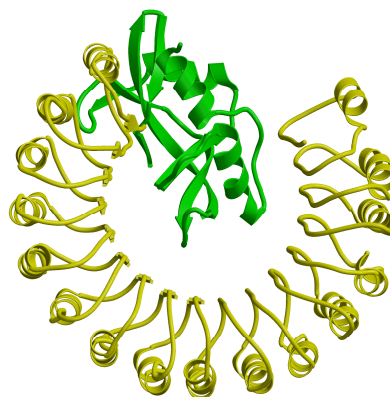


Fig. 12– Inibitore citosolico delle ribonucleasi (cRI) in giallo. In verde è rappresentata l’RNasiA nell’interazione con l’inibitore.

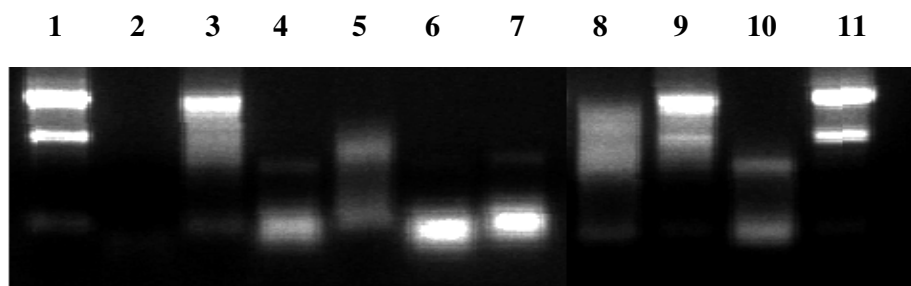


Figura 13- Elettroforesi su agarosio 1,2% delle reazioni di degradazione dell’rRNA da cellule HeLa. Canale 1: RNA non trattato (controllo negativo); canali 2 e 3: RNA trattato con RNasi A in assenza ed in presenza di cRI; canali 4 e 5: RNA trattato con ZF-RNasi 1 in assenza ed in presenza di cRI; canali 6 e 7: RNA trattato con ZF-RNasi 2 in assenza e in presenza di cRI; canali 8 e 9: RNA trattato con ZF-RNasi 3 in assenza e in presenza di cRI; canali 10 e 11: RNA trattato con hAng in assenza e in presenza di cRI.

diverso grado di attività delle tre proteine ricombinanti sull'rRNA 28S e 18S rispetto a quella dell'RNasi A e dell'hAng, utilizzata come riferimento e controllo positivo per questo tipo di saggio. Nel canale 1 è stato caricato il controllo negativo del saggio cioè una reazione allestita senza l'aggiunta di enzima dove è possibile apprezzare il profilo elettroforetico dell'rRNA non degradato: questo consente di essere sicuri che una eventuale attività registrata in tale saggio non sia dovuta a contaminanti. Nel canale 2 è stata caricata la reazione con l'RNasi A ed a seguire le reazioni allestite con ZF-RNasi 1, ZF-RNasi 2 e ZF-RNasi 3 in assenza e in presenza di cRI. I risultati di tale saggio confermano quelli già ottenuti con i saggi di precipitazione con RNA da lievito; infatti, nel canale dell'RNasi A non è visibile alcuna banda di acido nucleico, segno di una completa degradazione. Nel canale di ZF-RNasi 1 è ancora presente una banda di rRNA non completamente degradato a più alto peso molecolare che invece scompare nel canale di ZF-RNasi 2 mentre ZF-RNasi 3 risulta degradare solo parzialmente l'rRNA.

Per quanto riguarda l'inibizione dell'attività ribonucleasica da parte del cRI, l'RNasi A e l'angiogenina umana risultano essere fortemente inibite così come appare diminuire drasticamente la già debole attività di ZF-RNasi 3; l'attività di ZF-RNasi 1 non viene ridotta significativamente al pari di ZF-RNasi 2 la cui attività ribonucleasica non sembra risentire della presenza del cRI.

Il saggio di attività su rRNA da HeLa ha permesso dunque di mettere in evidenza una peculiare attività di ZF-RNasi 1 e 2 sull'rRNA rispetto a ZF-RNasi 3; questo pone in rapporto diretto le prime due proteine con la classe

delle angRNasi che mostrano in generale una preferenza di substrato verso il tRNA e l'rRNA.

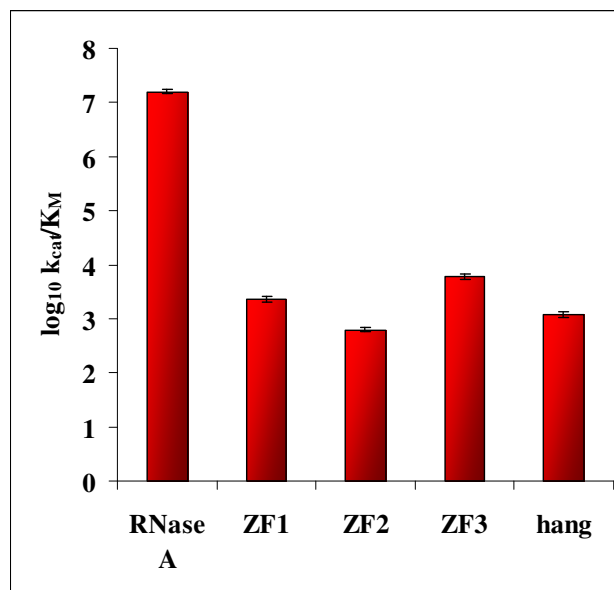
Determinazione di parametri cinetici mediante saggi fluorimetrici

La determinazione dei parametri cinetici delle tre proteine ricombinanti è stata effettuata utilizzando il 6-FAM-dArUdAdA-6-TAMRA, un piccolo substrato sintetico per le ribonucleasi la cui struttura chimica è mostrata in figura 9 dei Materiali e Metodi. La presenza di 6-carbossitetrametilrodamina al terminale 3' determina il *quenching* della fluorescenza della 6-carbossifluoresceina presente al terminale 5' (Bradley R.K. et al., 1999). Il taglio del substrato ad opera dell'RNasi A è accompagnato da un incremento della fluorescenza di circa 180 volte.

L'RNasi A taglia questo specifico substrato con un rapporto k_{cat}/K_M pari a $1.6 \pm 0.12 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ mentre l'angiogenina umana ad essa omologa, ha mostrato un valore della costante di specificità quattro ordini di grandezza inferiore ($K_{cat}/K_M = 7.4 \pm 0.72 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}$).

In questo saggio, le tre ZF-RNasi hanno mostrato valori di attività molto simili a quelli dell'angiogenina umana (dati riportati in tabella IV).

ZF-RNasi 2 è risultata essere meno attiva di ZF-RNasi 1 e 3 per cui i dati ottenuti con questo saggio sembrano essere in disaccordo con quelli relativi all'RNA da lievito e da cellule Hela. La ragione di tale discrepanza può essere spiegata supponendo una maggiore preferenza per tale substrato da parte di ZF-RNasi 1 e 3 rispetto a ZF-RNasi 2. Il substrato utilizzato nei saggi fluorimetrici è costituito, infatti, da un tetranucleotide sintetico (5'- ArUAA -3'). Tutti gli altri saggi, invece, sono stati condotti utilizzando RNA provenienti da una



Enzima	k_{cat}/K_M
RNase A	$1.6 \pm 0.12 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
ZF-RNasi1	$2.3 \pm 0.25 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
ZF-RNasi2	$6.3 \pm 0.50 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
ZF-RNasi3	$6.0 \pm 0.74 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
hAng	$7.4 \pm 0.72 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

Tabella IV- Valori delle costanti di specificità dell'RNasi A, delle ZF-RNasi e dell'hAng determinati mediante saggi fluorimetrici. Sopra: Grafico del $\log_{10} k_{cat}/K_M$ delle diverse proteine analizzate mediante saggi fluorimetrici.

fonte naturale cioè un acido ribonucleico caratterizzato da un'estrema variabilità di sequenza.

pH e forza ionica ottimali per l'attività delle tre ZF-RNasi

Per determinare le condizioni ottimali di forza ionica e pH per le tre ribonucleasi da pesce, è stato utilizzato il saggio di degradazione dell'RNA da lievito (Materiali e Metodi) variando concentrazione salina e pH del tampone utilizzato per il saggio.

Come mostrato in figura 14 le tre ribonucleasi presentano un caratteristico andamento a campana della curva dell'attività ribonucleasica in funzione del pH con dei massimi leggermente diversi: ZF-RNasi 1 presenta infatti un picco di attività a pH 6,5, ZF-RNasi 2 a 7,5 mentre ZF-RNasi 3 ha un valore di pH ottimale compreso tra 6,5 e 7,0.

I valori di pH ottimali di ZF-RNasi 1 e 3 rendono tali enzimi più simili ai membri della famiglia delle nptRNasi; essi hanno infatti il loro massimo di attività a pH 6,5-7,0. ZF-RNasi 2 risulta invece avere un'attività massima ad un valore di pH che è caratteristico delle ribonucleasi appartenenti alla famiglia delle pt/npt RNasi e cioè pari a 7,5 (vedi Introduzione).

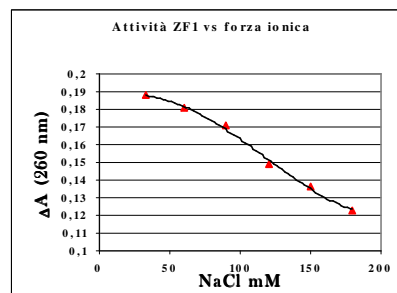
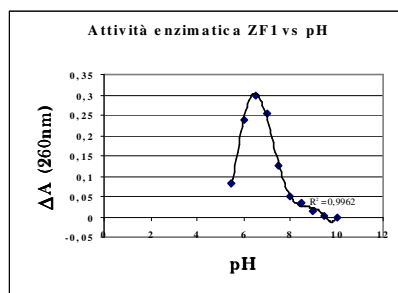
Per quanto riguarda la forza ionica, le curve dell'attività di ZF-RNasi 1 e 2 in funzione della concentrazione di NaCl presentano un andamento sigmoide decrescente mentre la curva di ZF-RNasi 3 presenta un andamento a campana con un massimo corrispondente ad una concentrazione salina pari a 90mM.

In tutti e tre casi si osserva comunque una drastica riduzione dell'attività enzimatica ad elevati valori di forza ionica e questo accomuna le tre proteine da *zebra-fish* alle nptRNasi; le ptRNasi mostrano al contrario un incremento

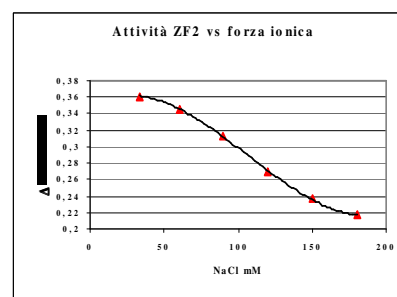
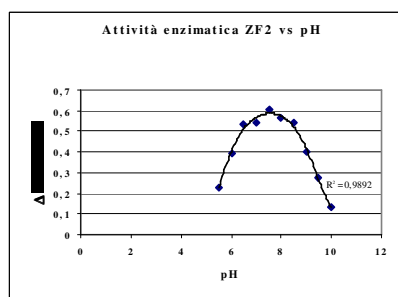
pH

Forza ionica

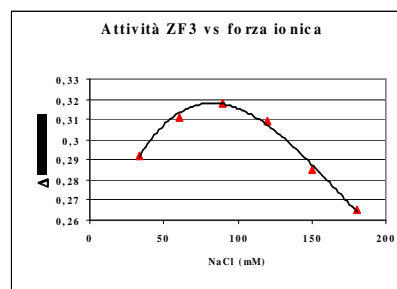
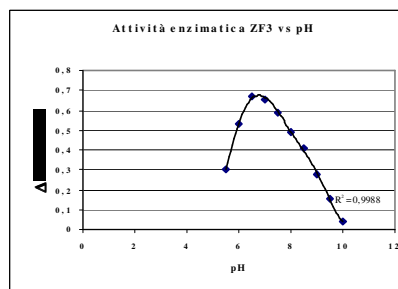
ZF1



ZF2



ZF3



hAng

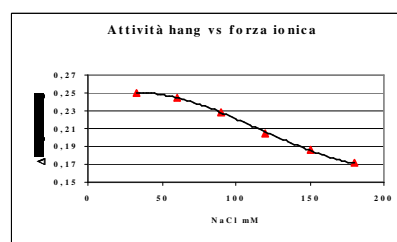
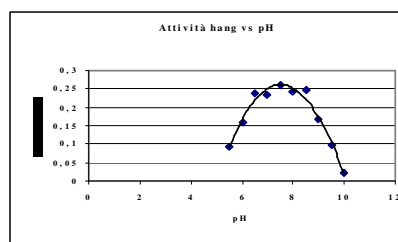


Figura 14- Grafici della variazione di attività (espressa in termini di assorbanza dei surnatanti nei saggi di precipitazione utilizzati per le determinazioni) delle tre ZF-RNasi e dell'hAng in funzione del pH e della forza ionica del tampone.

dell'attività ribonucleasica all'aumentare della concentrazione di NaCl da 50 a 300mM (Sorrentino S. *et al.*, 1997).

Attività angiogenica delle ribonucleasi da *zebra-fish*

Le analisi di sequenza, come detto sopra, hanno messo in evidenza che le tre ribonucleasi da *zebra-fish* mostrano una maggiore identità con l'angiogenina umana rispetto a quella che presentano con l'RNasi A; si è dunque deciso di verificare se le ZF-RNasi fossero in grado di stimolare la formazione di nuovi vasi sanguigni.

A tal scopo si è utilizzato un saggio che prevede la crescita di cellule endoteliali su Matrigel, un terreno di coltura solido. Come mostrato in figura 15, l'aggiunta al terreno di coltura di 200ng/mL delle ZF-RNasi 1 e 2 porta alla formazione di microtubuli in modo del tutto analogo a quanto avviene per l'angiogenina umana. ZF-RNasi 3, invece, non mostra una apprezzabile attività angiogenica. Inoltre, l'attività angiogenica di ZF-RNasi 1 e 2 è completamente inibita dal cRI.

Tale risultato potrebbe apparire contraddittorio se messo in relazione con gli esperimenti di inibizione dell'attività ribonucleasica su rRNA da HeLa; infatti l'attività enzimatica di ZF-RNasi 1 e 2 non sembrava essere influenzata dall'inibitore come invece accade per l'attività angiogenica. Una possibile spiegazione potrebbe essere che l'interazione tra le proteine ricombinanti e l'inibitore avvenga in modo tale da lasciare libero il sito attivo delle ZF-RNasi, creando al contempo un ingombro sterico che impedirebbe il legame delle angiogenine/ribonucleasi da pesce con il recettore di membrana delle cellule HUVE.

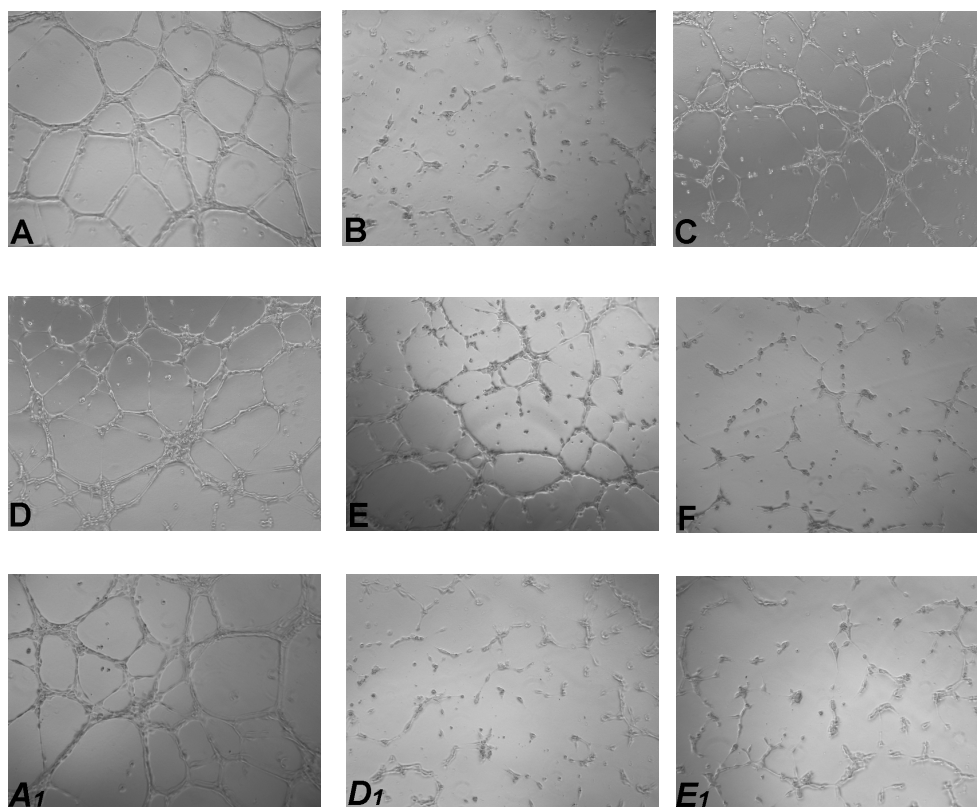


Figura 15- A: controllo positivo
 B: controllo negativo
 C: angiogenina umana
 D: ZF-RNasi 1
 E: ZF-RNasi 2
 F: ZF-RNasi 3
 A₁: controllo positivo + cRI 1:5
 D₁: ZF-RNasi 1 + cRI 1:5
 E₁: ZF-RNasi 2 + cRI 1:5

CONCLUSIONI

Per la prima volta sono state individuate tre proteine (ZF-RNasi 1, 2 e 3) dotate di attività ribucleasica nei pesci. I cDNA, ritrovati in *zebra-fish* (*Danio rerio*), sono stati clonati e le proteine ricombinanti sono state espresse e purificate.

Le ZF-RNasi hanno una sequenza che presenta delle caratteristiche peculiari dei membri della superfamiglia delle ribonucleasi ed inoltre hanno una significativa identità di sequenza con l'RNasiA e con l'hAng.

La loro caratterizzazione enzimatica ha rivelato una ridotta attività catalitica comunque comparabile a quella dell'hAng. Inoltre saggi di attività angiogenica *in vitro* hanno messo in evidenza la capacità di ZF-RNasi 1 e 2 di stimolare la formazione di strutture microtubulari in cellule HUVE cresciute su terreno solido.

I dati raccolti in questo lavoro di tesi portano dunque a concludere che le tre proteine isolate da *zebra-fish* costituiscono gli antenati delle ribonucleasi dei tetrapodi e i capostipiti delle angiogenine dei mammiferi.

Progetti futuri comprendono l'ulteriore caratterizzazione enzimatica oltre all'analisi del ruolo di tali proteine *in vivo*. Risultati preliminari di esperimenti di ibridazione *in situ* condotti dalla dott.ssa Quarto, mostrano un pattern di espressione differenziale delle tre ZF-RNasi nei vari stadi di sviluppo di *zebra-fish* oltre ad una loro tessuto-specificità. Tali dati fanno supporre dunque che ciascuna ZF-RNasi abbia un ruolo specifico che si esplica in maniera differente sia da un punto di vista spaziale che temporale.

BIBLIOGRAFIA

- Beintema, J. J., H. J. Breukelman, A. Carsana, and A. Furia. 1997. Evolution of vertebrate ribonucleases: ribonuclease A superfamily. Pp. 245–269 in G. D'Alessio and J. F. Riordan, eds. Ribonucleases: structures and functions. Academic Press, New York.
- Beintema, J. J. 1998. The ribonuclease A superfamily. *Cell. Mol. Life Sci.* 54:763–765.
- Beintema J.J. and Kleineidam,R.G. (1998) The ribonuclease A superfamily: general discussion. *Cell. Mol. Life Sci.*, 54, 825–832.
- Blank A., Sugiyama RH, Dekker CA (1982). Activity staining of nucleolytic enzymes after sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis : use of aqueous isopropanol to remove detergent from gels. *Anal. Biochem.*; 120:267-75.
- Bradley R. Kelemen,Tony A. Klink ,Mark A. Behlke, Shad R. Eubanks, Peter A. Leland and Ronald T. Raines. Hypersensitive substrate for ribonucleases. *Nucleic Acids Research* 1999 Jul.12, 27(18): 3696-3701.
- Peter A. Leland, Kristine E. Staniszewski, Chiwook Park, Bradley R. D'Alessio, G., and J. F. Riordan, eds. 1997. Ribonucleases: structures and functions. Academic Press, New York.
- D'Alessio G. New and cryptic biological messages from RNases. *Trends Cell Biol.* 1993 Apr;3(4):106–109.
- De Llorens R., Arùs C., Parès X. and. Cuchillo C. M. Chemical and computer graphics studies on the topography of the ribonuclease A active site cleft. A model of the the enzyme-pentanucleotide substrate complex. *Prot. Eng.* 1989;2(6) 417-429.

- Di Donato A, Cafaro V, de Nigris M, Rizzo M, D'Alessio G. The determinants of the dimeric structure of seminal ribonuclease are located in its N-terminal region. *Biochem Biophys Res Commun.* Aug 16;194(3):1440-5.
- Hamann KJ, Barker RL, Loegering DA, Pease LR, Gleich GJ. Sequence of human eosinophil-derived neurotoxin cDNA: identity of deduced amino acid sequence with human nonsecretory ribonucleases. *Gene.* 1989 Nov 15;83(1):161–167.
- Hu GF, Riordan JF, Vallee BL. (1997). A putative angiogenin receptor in angiogenin-responsive human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Mar 18;94(6):2204-9.
- Kelemen and Ronald T. Raines. The Ribonucleolytic Activity of Angiogenin. *Biochem.* 2002 Sep 12;41, 1343-1350.
- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227:680-685.
- Maniatis T., Fritsch E.F. and Sambrook J. (1982).
- Moroianu J, Riordan JF. (1994). Nuclear translocation of angiogenic proteins in endothelial cells: an essential step in angiogenesis. *Biochemistry.* Oct 25;33(42):12535-9.
- Parés X, Nogués MV, de Llorens R, Cuchillo CM. (1991). Structure and function of ribonuclease A binding subsites. *Essays Biochem.* 1991;26:89-103
- Raines, R. T. 1998. Ribonuclease A. *Chem. Rev.* 98:1045-1065.
- Shapiro R. , Riordan J. F. and Vallee B. L. (1986) Characteristic ribonucleolytic activity of human angiogenin. *Bioch.* 25: 3527-3532.

- Shapiro R, Vallee BL. (1989). Site-directed mutagenesis of histidine-13 and histidine-114 of human angiogenin. Alanine derivatives inhibit angiogenin-induced angiogenesis. *Biochemistry*. Sep 5;28(18):7401-8.
- Sorrentino, S. and Libonati, M. 1994. Human pancreatic-type and nonpancreatic-type ribonucleases: A direct side-by-side comparison of their catalytic properties. *Arch. Biochem. Biophys.* 312: 340–348.
- Sorrentino S. and Libonati,M. (1997) Structure-function relationships in human ribonucleases: main distinctive features of the major RNase types. *FEBS Lett.*, 404, 1–5.
- Sorrentino, S. (1998) Human extracellular ribonucleases: multiplicity, molecular diversity and catalytic properties of the major RNase types. *Cell. Mol. Life Sci.* 54, 785–794
- Sorrentino, S., Glitz, D.G., Hamann, K.J., Loegering, D.A., Checkel, J.A., and Gleich, G.J. 1992. Eosinophil-derived neurotoxin and human liver ribonuclease: Identity of structure and linkage of neurotoxicity to nuclease activity. *J. Biol. Chem.* 267: 14859–14865.
- Strydom D.J. (1998) The angiogenins. *Cell. Mol. Life Sci.*, 54, 811–824.
- Xu ZP, Tsuji T, Riordan JF, Hu GF. (2002). The nuclear function of angiogenin in endothelial cells is related to rRNA production. *Biochem Biophys Res Commun.* Jun 7;294(2):287-92.
- Yakovlev, G., Moiseyev, G.P., Sorrentino, S., De Prisco, R. & Libonati, M. (1997) Single-strand-preferring RNases degrade double-stranded RNA by destabilizing its secondary structure. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 15, 243–250.